羽毛分解菌之篩檢技術

林良怡[1]、陳曉萱[1]、陳淑娟[1]、羅致逑[2,3]

中文摘要

本研究於農業環境中篩選到4株羽毛分解菌，對於4克羽毛分解力為75.5% - 80.3%。各羽毛分解液pH值由pH 7.2升至8.2 - 8.9。其中1株菌株所得到之羽毛粉消化率為81.9%。

關鍵詞：羽毛、角蛋白酶、羽毛分解率

前言

由於現代化大規模的家禽養殖業生產大量羽毛廢棄物。據統計羽毛類廢棄物於 102年有27,003公噸，103年有 27,804公噸，羽毛廢棄物在環境中的累積日益增多，已成為固體廢棄物處理問題的一部分。羽毛的主要成分是角蛋白，國內外有許多研究探討羽毛廢棄物之利用性。如 Choi與Nelson (1996) 利用水解羽毛粉作為緩效性氮肥，Ramakrishnan *et al.* (2011) 利用羽毛粉製作微生物培養基。Grazziotin *et al.* (2006) 認為細菌分解羽毛的產物可做為動物飼料；Yong *et al.* (2013) 亦提及分解羽毛釋出之養份可增加飼料養分或作為肥料使用。本研究自農業環境中篩選具分解羽毛能力之菌株，以探討廢棄羽毛在農業肥料及畜牧飼料之應用性。

---

1. 農業藥物毒物試驗所研究助理
2. 農業藥物毒物試驗所研究員
3. 通訊作者. E-mail: lcc@tactri.gov.tw

材料與方法

一、供試菌株

1. 環境分離菌株：自行分離菌株。
2. 參考菌株：自食工所購買標準菌株 *Bacillus licheniformis* BCRC14353 及 *B. licheniformis* BCRC11594。

二、羽毛來源：福壽公司提供之白肉雞羽毛。

三、培養基

1. 1%酪蛋白磷酸緩衝液： 0.7 g/L KH_2PO_4，1.4 g/L K_2HPO_4，0.5g/L NaCl， 0.1 g/L $MgSO_4$，10 g/L casein，pH 7.2，15 g/L agar (Cai *et al.*, 2008)。
2. 2%羽毛磷酸緩衝液： 0.7 g/L KH_2PO_4，1.4 g/L K_2HPO_4，0.5g/L NaCl，0.1 g/L $MgSO_4$，pH 7.2及雞羽毛(整根、2%)。
3. 其他培養基：Luria-Bertani agar (LA)、Luria-Bertani broth (LB)。

四、羽毛分解菌之篩檢

1. 第一階段（酪蛋白分解力比較）

   將供試菌株以LA培養基活化 20小時後，以滅菌牙籤沾取單一菌落，點於酪蛋白培養基上，於 37 ℃培養 24小時後，計算透明環與菌落比。

2. 第二階段（單根羽毛分解力比較）

   配製羽毛磷酸緩衝液並分裝 10 mL於螺旋式管中，添加一根完整羽毛，高溫高壓滅菌後備用。添加適量菌量至試管中，於 37 ℃下培養 6天後觀查羽毛的完整性。

   羽毛分解力共分為0級至4級。0級(無明顯分解情形)，1級(部份分解，只有少許羽毛碎屑懸浮)，2級(羽毛明顯分解，且碎屑沉澱量多)，3級(羽毛呈粉碎狀，無法看出羽毛原本形狀)，4級(羽毛完全分解沒有殘留)。

3. 第三階段（4克羽毛分解力比較）

   配製 200 mL之羽毛磷酸緩衝液，並添加 4 g (2 %)羽毛於500mL三角瓶中，高溫

滅菌後，加入適量菌液於37℃、150 rpm、暗室下培養6天後，計算羽毛分解率(%)。

$$\text{羽毛分解率}(\%) = \frac{\text{初始重}(g) - \text{殘留重量}(g)}{\text{初始重}(g)} \times 100(\%)$$

五、羽毛分解液成分分析

1. 可溶性蛋白分析

以Bradford(1976)方法進行。吸光值以OD_{595} 測量。用來製作檢量線的標準品為：BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma USA) 標準液 (貯存液2 mg/mL)，BSA標準曲線配製濃度為5 μg/mL、10μg/mL、15μg/mL、20μg/mL及25μg/mL。

2. 角蛋白酶活性分析

取0.2 mL經適當稀釋之分解液，加入0.8mL 50mM Tris-HCl buffer (pH 8.5)含有5mg keratin azure之溶液，充分混勻，於 50℃下反應 60 min後加入 0.2 mL 10% TCA終止酵素反應。再以 4℃，10000 rpm 離心 10 min，取上清液以 595 nm測定吸光值。角蛋白酶之酵素活性定義（U）：使 595 nm吸光值增加 0.01/小時者稱為一酵素活性單位 (Letourneau *et al.*, 1998)。

結果與討論

一、羽毛分解菌之篩檢

1. 第一階段：酪蛋白分解力比較

自環境樣本中進行具酪蛋白水解酶之能力。再自當中挑選透明環/菌落比值大於兩株專利菌株者，進行羽毛分解力之分析（圖1）。

2. 第二階段：單根羽毛分解力比較

得到羽毛分解能力3級至4級之分離菌共59株，進行下一階段4克羽毛分解試驗。

3. 第三階段：4克羽毛分解力比較

2號菌株對羽毛分解率高於二專利菌株(表1)。3號菌株羽毛分解液之角蛋白酶活性高於二專利菌株(表1)。培養 6天後消化液的pH值由7.2升至 8.7 - 8.9(表1)、8.2 - 8.5(表1)。

Suntornsuk, W.與L. Suntornsuk(2003)曾利用 1 %、3 %及 5 %等不同羽毛添加量培養 *Bacillus* sp. FK46，認為羽毛分解菌的分解率隨羽毛添加量的增加而降低。Cheng *et. al*(1995)的研究亦指使用*B. licheniformis* PWD-1分解菌，在羽毛量為1 %時的蛋白酶活性最大。Suntornsuk, W.與L. Suntornsuk(2003)研究亦提出在pH 9時，羽毛分解菌之生長、羽毛分解率及角蛋白活性均最大。本研究結果顯示此4株羽毛分解菌之分解液pH值由pH 7.2升至8.2 - 8.9之間。

4. 角蛋白酶活性比較

本研究試驗菌株所得之粗酵素角蛋白酶活性再與相同方法之文獻(Nagal 2010, Cai *et al.*, 2008) 比較效果，顯示篩選出具有羽毛分解力之環境分離菌株可再進一步探討其應用性(圖2)。

結論

本研究結果顯示自環境中得到之分離株可分解羽毛，將續探討用於飼料的營養添加或肥料的可行性。

引用文獻

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. Vol.72:248-254.

Cai, C. G., B. G. Lou, and X. D. Zheng. 2008. Purification and characterization of keratinase from a new *Bacillus subtilis* strain. J. Zhejiang Univ. Sci. B. 9(9):713-720.

Cheng, S. W., H. M. Hua, S. W. Shena, H. Takagia, M. Asanoab, and Y. C. Tsai, 1995. Production

and Characterization of Keratinase of a Feather-degrading *Bacillus licheniformis* PWD-1. Biosci. Biotechnol. Biochem. 59(12)：2239-2243.

Choi, J. M. and P. V. Nelson, 1996. Developing a slow-release nitrogen fertilizer from organic sources: II. using poultry feathers. J. Am. Soc. Hortic. Sci . 121(4):634-638.

Grazziotin, A., F. A. Pimentel, E. V. de Jong, and A. Brandelli, 2006. Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. Animal Feed Sci. Technol. 126:135-144.

Letourneau, F., V. Soussotte, P. Bressollier, P. Branland, and B. Verneuil, 1998. Keratinolytic avtivity of *Streptomyces* sp. S.K1-02 a new isolated strain. Lett. Appl. Microbiol. 26(1):77-80.

Nagal, S., and P. C. Jain. 2010. Feather degradation by strains of *Bacillus* isolated from decomposing feathers. Braz. J. Microbiol. 41: 196-200.

Ramakrishnan, J., H. Balakrishnan, S. T. K. Raja, N. Sundararamakrishnan, S. Renganathan, and V. N. Radha. 2011. Formulation of economical microbial feed using degraded chicken feathers by a novel *Streptomyces* sp. mitigation of environmental pollution. Braz. J. Microbiol. 42:825-834.

Suntornsuk, W., and L. Suntornsuk. 2003. Feather degradation by *Bacillus* sp. FK 46 in submerged cultivation. Bioresour. Technol. 86:239-243.

Tiwary, E, and R. Gupta. 2012. Rapid Conversion of Chicken Feather to Feather Meal Using Dimeric Keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-15. J. Bioprocess. Biotech. 2 (4):1-5.

Yong, B., B. Q.Yang, and H. Feng, 2013. Efficient degradation of raw chicken feather into soluble peptides and free amino acids by a newly isolated *Bacillus subtilis* S1-4. Res. J. Biotechnol. 8(9):48-55.

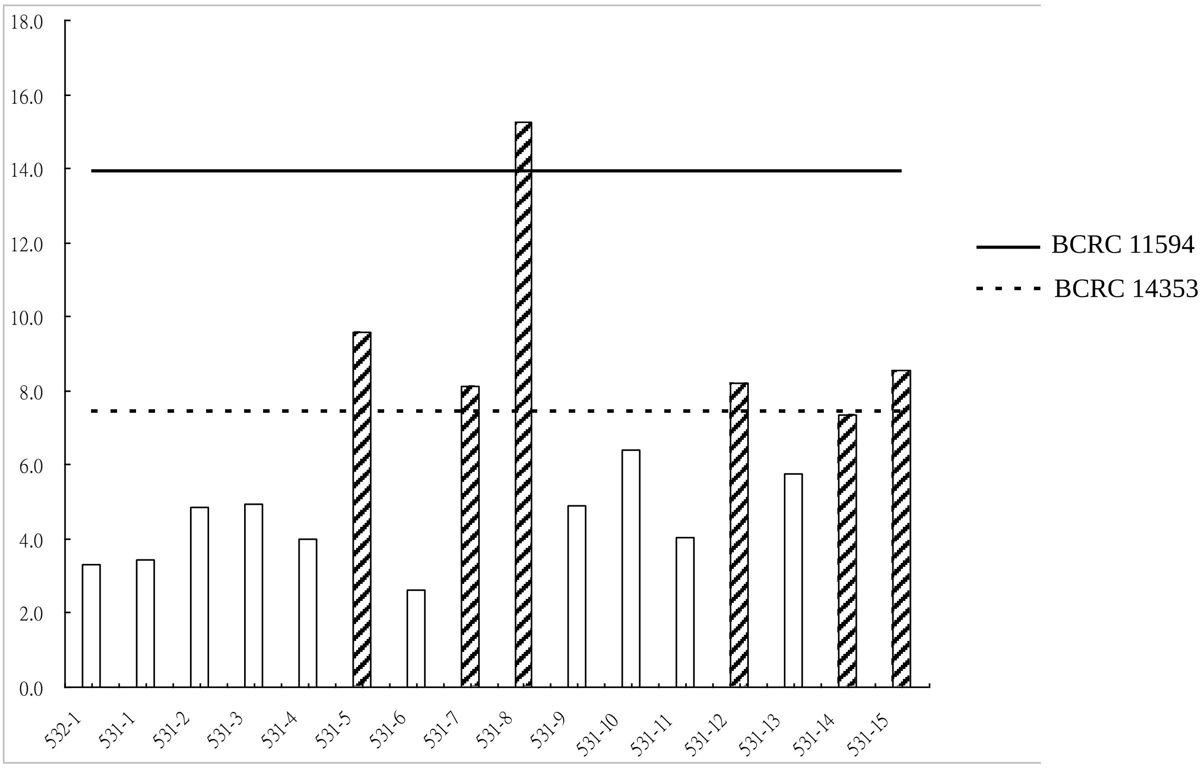

圖1、分離菌株在酪蛋白培養基上之透明環與菌落之比值。

Fig. 1 Halo : colony ratio of bacterial isolates in casein agar-medium.

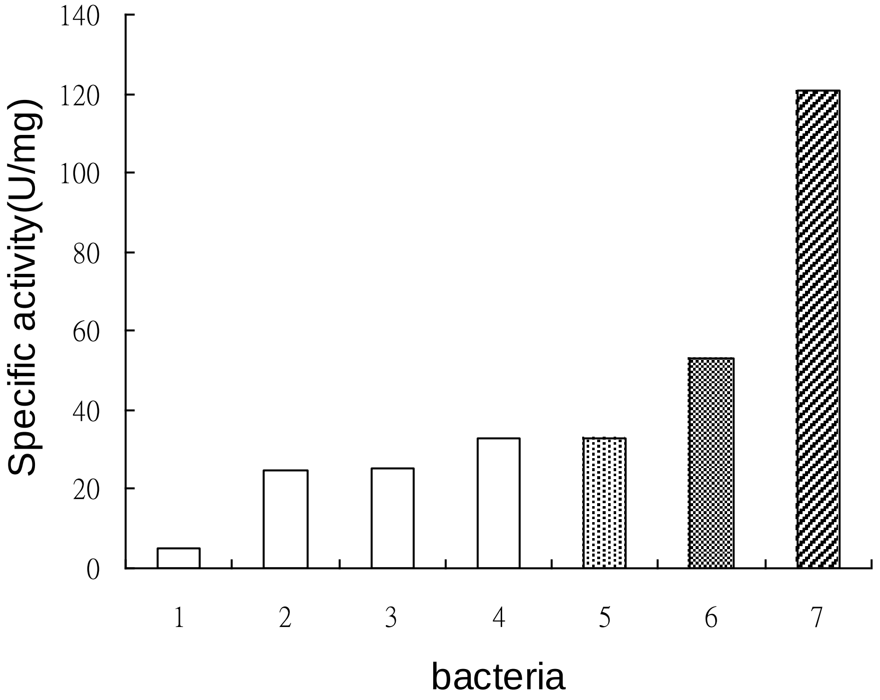

圖2.角蛋白酶比活性之比較。1-4：文獻值，5：BCRC 143553，6：BCRC 11594，7：研究室菌株。

Fig. 2 Comparison of keratinase specific artivities. 1-4: cited from references. ; 5: BCRC 143553 ; 6：BCRC 11594; 7：lab isolate.

表1.不同分離菌株對4克羽毛分解後之pH、分解率、可溶性蛋白及角蛋白酶活性之比較。

Table 1. The pH, feather degradation, soluble protein, and keratinase activity of different bacterial isolates incubated with 2 % chicken feather after 6 days.

Degradation solution	pH	Degradation rate (%)	Soluble protein (μg mL-1)	Keratinase activity (U mL-1)
Blank z	6.9 ± 0.0	7.6 ± 4.2	25.1 ± 1.3	0.0 ± 0.0
BCRC11594	8.3 ± 0.1	74.1 ± 6.3	495.1± 1.5	156.4 ± 9.7
BCRC14353	8.5 ± 0.1	66.0 ± 4.8	376.3 ± 62.6	147.6 ± 4.5
1 [y]	8.4 ± 0.1	75.8 ± 7.5	303.3 ± 55.2	155.3 ± 3.6
2 [y]	8.4 ± 0.1	80.3 ± 3.2	449.3 ± 56.8	82.7 ± 2.9
3 [y]	8.2 ± 0.0	75.5 ± 4.1	246.4 ± 61.4	167.7 ± 5.4
4 [y]	8.4 ± 0.1	78.7 ± 5.5	239.1 ± 60.2	73.7 ± 6.7

[z]：no bacteria

[y]：bacteria isolates.

Screening of Feather Degrading Bacteria From Environment.

Liang-Yi Li [1], Shiao-Hsuan Chen [1], Shu-Chuan Chen [1], and Chi-Chu Lo*
Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture,
11, Kuang-Ming Road, Wufong, Taichung County, Taiwan, ROC.

Abstract

The feather degradation rates of four isolates were 49.4%~54.9% (yellow feather), and 75.5%~80.3% (white feather), respectively. The pH values in culture solution were increased from 7.2 to 8.2 - 8.9.

Key word： Feather, Keratinase, Degradation rate

---

1. Research assistant, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture.
2. Researcher, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture.
3. Corresponding author. E-mail: lcc@tactri.gov.tw